Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. D. Waller
o. Lehrstuhl und Abteilung Innere Medizin II
Vorstand: Prof. Dr. H. D. Waller

MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER IMPULSCYTOPHOTOMETRIE FÜR DNS-UNTERSUCHUNGEN AN BLUTZELLEN

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Elisabeth Reichert
aus Weil im Schönbuch
1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0088

Druck- und Verlagsanstalt
Werner Blasaditsch · 89 Augsburg · Theodor-Heuß-Platz 3 · Telefon (0821) 51 85 63
Printed in Germany

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. D. Waller
o. Lehrstuhl und Abteilung Innere Medizin II
Vorstand: Prof. Dr. H. D. Waller

MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER IMPULSCYTOPHOTOMETRIE FÜR DNS-UNTERSUCHUNGEN AN BLUTZELLEN

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Elisabeth Reichert
aus Weil im Schönbuch
1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. E. Körber
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. D. Müller Professor Dr. H.D. Waller
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. M.F. Rajewsky
3. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Göbel

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung S. 3

II. Methodik

A) Präparation der Suspension S. 4
B) Impulscytophotometer ICP 11 S. 6
C) Fehlerdiskussion S. 6
D) Statistik S. 8
E) Untersuchungsgut S. 8

III. Ergebnisse

A) Beispiel für ein typisches Histogramm einer Blutprobe S. 9
B) Beispiel für ein typisches Histogramm eines Knochenmarkpunktates S. 9
C) Auswertung der Histogramme S. 9
D) Der Zellanteil in S- und G_2-Phase S. 14
E) Zellverteilung in den einzelnen Abschnitten der S- und G_2-Phase S. 15
F) Befunde unter cytostatischer Therapie S. 15

IV. Diskussion S. 18

V. Zusammenfassung S. 28

VI. Abbildungen S. 29

Literaturverzeichnis S. 49

I. Einführung

Die Zellproliferation bestimmt neben der Zelldifferenzierung und der Zellausschwemmung die Kinetik und damit das morphologische Bild des Knochenmarks. Die proliferierenden Zellen durchlaufen im Generationszyklus nach der Mitose hintereinander die postmitotische Ruhephase (G_1-Phase), die DNS[+])-Synthesephase (S-Phase) und vor dem Eintritt in eine erneute Mitose die prämitotische Ruhephase (G_2-Phase) (KILLMANN et al. 1964) (Abb. 1).

Der normale Ablauf des Zellzyklus ist bei manchen Krankheiten gestört. So ist bei Leukämien die postmitotische Ruhephase und die Dauer der DNS-Reduplikation verlängert (KILLMANN 1968). Bei der megaloblastären Anämie schließt ein Teil der Zellen die DNS-Synthese nicht ab, sondern geht vorher zu Grunde, Zellen der G_2-Phase werden arretiert (FITZGERALD et al. 1966, WAKISAKA et al. 1966).

Eine genaue Bestimmung der Veränderungen in der S- und G_2-Phase bei den verschiedenen Bluterkrankungen geben daher eine Möglichkeit, die der Erkrankung zu Grunde liegende Störung des Generationszyklus und ihre Bedeutung für die Zellkinetik zu erfassen. Darüber hinaus können Änderungen im Ablauf der DNS-Synthesephase unter der Behandlung aufgedeckt werden, die unter S-Phasenspezifischen Cytostatika zu erwarten sind.

Die Erfassung des Zellanteils in der S- und G_2-Phase erfolgt in der vorliegenden Arbeit mit dem Impulscytophotometer (DITTRICH und GÖHDE 1969). Die Zuordnung der Zellen in die jeweiligen Phasen des Generationszyklus geschieht auf Grund des unterschiedlichen DNS-Gehaltes, der im Durchflußverfahren in der fluorochromierten Einzelzelle bestimmt werden kann. So ist es nicht nur möglich, den Zellanteil in S- und G_2-Phase, sondern auch Zellanhäufungen innerhalb der S- und G_2-Phase zu bestimmen.

[+]) DNS = Desoxyribonucleinsäure

II. Methodik

Die Impulscytophotometrie ermöglicht im Durchflußverfahren (DITTRICH und GÖHDE 1969) in jeder Sekunde bis zu 1000 fluorochromierte Zellen zu erfassen.
Je nach der Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes kann man Zellproteine, Nucleinsäuren oder zelluläre Antikörper und Antigene erfassen. Akriflavin ist ein DNS-spezifischer-, Ethidium bromide (LE PECQ und PAOLETTI 1967) ein Nucleinsäure-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff.
Bei der Akriflavinfärbung (Technik nach BÖHM und SPRENGER 1968) sind die Zellen einer starken mechanischen Belastung ausgesetzt, da mehrfache Zentrifugationen nötig sind.

A. Präparation der Suspension

1. Fixation

Heparinisierte periphere Blutproben (Vetren) werden im Verhältnis 3 : 1, heparinisierte Sternalpunktate im Verhältnis 1 : 1 mit Plasmaexpander (Macrodex) versetzt. Nach 45 Minuten bei 37 °C wird der Überstand abpipettiert und bei 800 Umdrehungen 10 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wird in wenig 0,9 %iger Natriumchloridlösung suspendiert und unter kräftigem Rühren bei -30 °C in 96 %igen Äthylalkohol eingetropft (Gefriersubstitutionsmethode mit Alkohol). Die Mindestfixierungsdauer beträgt 30 Minuten.

2. Färbung

a) Mit Ethidium bromide (Fa. Calbiochem, Los Angeles)

Nach der Zentrifugation werden die alkoholfixierten Zellen mit Trispuffer (pH=7,5) ausgewaschen. Nach dem Auswaschen wird Ethidium bromide mit Trispuffer im Verhältnis 1 : 20 000 zugegeben und aufgeschüttelt. Eine zweistündige Einwirkungsdauer bei Zimmertemperatur ist erforderlich.

Die gefärbten Zellen werden wieder mit Trispuffer ausgewaschen. Die Zellkonzentration darf maximal 30 000/ml betragen, gegebenenfalls wird mit Trispuffer verdünnt.

b) Mit Akriflavin (Serva Heidelberg)

Die wie oben fixierte Zellsuspension wird zentrifugiert, die sedimentierten Zellen in 2 normale Salzsäure suspendiert. Im Wärmebad bei 28 °C wird die Hydrolyse 20 Minuten unter leichtem Schütteln der Probe durchgeführt. Die anschließende 10 minütige langsame Zentrifugation (1000-1500 Umdrehungen) beendet die Gesamthydrolysendauer von 30 Minuten. Das Sediment wird in die Farblösung suspendiert. Für die Farblösung wird Akriflavin als 0,01 %ige Schiffsche Lösung nach GRAUMANN (1953) angesetzt. Nach einstündiger Färbedauer wird 3 x 7 Minuten in Salzsäure-Alkohol (auf 100 ml 70 %iges Äthanol 3 ml konzentrierte Salzsäure) und anschließend einmal in Aqua destillata gespült. Jedes Auswaschen erfordert das Zentrifugieren der Zellen und Dekantieren des Überstandes. Schließlich werden die Zellen in destilliertem Wasser suspendiert.

3. Nachbehandlung

Ein Ultraschallstoß von 5 Sekunden bei einer Intensität von 2 Skalenteilen des Branson Sonic Power, Mod. S 75 Ultraschallgerätes mit Mikrospitze (MASIN und MASIN 1969) und eine nachfolgende Filtration der Zellsuspension durch ein Drahtnetz von 50 µ Maschengröße (Fa. Retsch, Haan, Rhld.) soll eventuell noch vorhandene Zellaggregate beseitigen.
Nach Fluorochromierung mit Akriflavin (DNS-spezifisch) bzw. Ethidium bromide (DNS-RNS-spezifisch) erhielten wir prinzipiell ähnliche Meßergebnisse. Abb. 3 zeigt die gute graphische Übereinstimmung der Kurven. Um die stärkere mechanische Belastung der Zellen bei der Akriflavinfärbung und damit eine mögliche zelltrümmerbedingte Verfälschung der Meßergebnisse zu vermeiden, verwendeten wir überwiegend Ethidium bromide.

B. Impulscytophotometer ICP 11 (Abb. 2)

Die Untersuchungen wurden mit einem Impulscytophotometer ICP 11 der Firma Phywe Göttingen durchgeführt. Die theoretischen und technischen Grundlagen für die Impulscytophotometrie wurden von SPRENGER und BÖHM (1971) und GÖHDE und DITTRICH (1969) erarbeitet.

Wirkungsweise:

Die Vakuumpumpe (7) saugt die als Suspension vorliegende Zellprobe (1) zusammen mit der Spülflüssigkeit (6) an. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Einzelzellen gelangen an die Meßöffnung (2). Diese wird durch fluoreszenzanregendes Licht einer Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 100 (4) über einen dichroitischen Spiegel (3) gleichmäßig ausgeleuchtet (Köhlersche Beleuchtung). Beim Durchtritt der Zellen durch die Meßöffnung senden sie Fluoreszenzlichtimpulse aus, die im Photomultiplier (5) Photostromimpulse erzeugen. Der Vielkanalanalysator (8) sortiert die Photostromimpulse in Amplitudenklassen. Jeder Klasse ist ein Kanal im Speicher des Analysators zugeordnet. Die Information des Speichers wird nach der Messung abgerufen und durch den Linienschreiber als Histogramm (9) ausgeschrieben. Im Histogramm gibt die Ordinate die relative Zellzahl, die Abszisse den DNS-Gehalt der Einzelzellen an.

C. Fehlerdiskussion

1. Durch die Präparation bedingt

a) Zellaggregation

Abb. 4 zeigt das Histogramm einer Blutzellsuspension ohne Ultraschallbehandlung mit einer besonders ausgeprägten Zellaggregation. Dem Maximum mit der höchsten Amplitude, das durch die Fluoreszenzsignale der einzeln erfaßten Zellen bedingt ist, folgen weitere Maxima, die durch eine Aggregation von 2, 3, 4 und mehr Zellen her-

vorgerufen sind. Die Wahrscheinlichkeit einer Verklumpung von 2, 3 und mehr Zellen verhält sich theoretisch wie $1/q : 1/q^2 : 1/q^3$ ... und ist annäherungsweise den Flächeninhalten unter den einzelnen Maxima der Abb. 4 proportional. In Einzelfällen können Zellaggregate trotz Ultraschallbehandlung nicht vollständig beseitigt werden. Sind in einem Histogramm bei 10facher Verstärkung der Amplitude noch weitere Maxima vorhanden, die auf Zellaggregationen hinweisen, wird versucht, gemäß obiger Formel den Anteil der Verklumpung zweier Zellen von einer biologisch bedingten Verdopplung des Fluoreszenzsignales abzugrenzen.

b) Zelltrümmer

Einzelne besonders schwache Fluoreszenzsignale sind nach SPRENGER et al. (1971) durch präparativ entstandene Zellkernfragmente hervorgerufen. Sie finden sich häufiger nach Akriflavinfärbung, wo vielfache Zentrifugationen nötig sind.

c) Dauer der Fixation

Eine 24 stündige Alkoholfixation beeinflußt die Fluoreszenzmessung nicht. SPRENGER et al. (1971) fand keine Änderung des Feulgen-DNS-Gehaltes nach 5 tägiger Alkoholfixation. Wenn die Zellen bis zu 5 Stunden in 0,9 %iger Natriumchloridlösung bleiben, ist nach SPRENGER et al. (1971) keine cytophotometrisch meßbare Veränderung des DNS-Gehaltes festzustellen.

2. Durch das Gerät bedingt

a) Antikoizidenzschaltung

Die Antikoizidenzschaltung verhindert bereits in der Phase des Impulsanstieges, daß ein zweiter Impuls registriert wird. Daher können 2 Zellen fälschlich nur dann gleichzeitig gemessen werden, wenn sie wirklich exakt im selben Augenblick in der Blende erscheinen.

b) Durchflußrate

Je höher die Zelldurchflußrate, umso häufiger werden die Impulse zweier Zellen gleichzeitig erfaßt und summiert. Bei einer Durchflußrate von unter 500 Zellen/sec liegt der Fehler weit unter 1 °/oo.

c) Photooxidation

Der Einfluß der Belichtung (Photooxidation) kann vernachlässigt werden, da die Zelle nur 50 Mikrosekunden im Strahlengang liegt.

D. Statistik

Zu den statistischen Berechnungen wurden die graphischen Tafeln von KOLLER (1940) herangezogen.

E. Untersuchungsgut

Insgesamt kamen 395 periphere Blut- und Knochenmarksproben im Krankheitsablauf von 101 Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, von 4 Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg [+] (Dir. Prof. Dr. Schettler) und 14 Patienten des Katharinenhospitals Stuttgart [+] (Chefarzt Dr. Streicher) mit Störungen der Granulopoese, der Erythropoese und Thrombopoese bei verschiedenen Kreinheitsbildern zur Untersuchung. Die Kasuistik wird im einzelnen soweit erforderlich bei der Besprechung der Ergebnisse angegeben. Vergleichende Untersuchungen wurden schließlich noch bei einer malignen Permanentlinie BICR/M1R$_K$ [++] nach Hydroxyureagabe vorgenommen.

[+] Für die Möglichkeit diese Patienten zu untersuchen, danke ich Herrn Dr. Ritz und Herrn Chefarzt Dr. Streicher.

[++] Für die Überlassung der Meßergebnisse danke ich Herrn Privatdozent Dr. Kajewsky vom Max-Planck-Institut für Virusforschung Tübingen.

III. Ergebnisse

Die an den untersuchten Blut- und Knochenmarksproben gewonnenen Ergebnisse können nicht auf bestimmte Zellpopulationen bezogen werden. Sie stellen vielmehr Durchschnittswerte der in der Probe enthaltenen Zellen aller Reifungsgrade dar.

A. Beispiel für ein typisches Histogramm einer Blutprobe

Abb. 5 zeigt eine Blutprobe eines gesunden Probanden mit normalem Differentialblutbild. Alle Zellen gruppieren sich um einen mittleren DNS-Gehalt. Nach dem in der Einführung Gesagten, muß es sich um G_1-Zellen handeln.

B. Beispiel für ein typisches Histogramm eines Knochenmarkpunktates

Bei der Patientin La (Lymphosarkom, R/W = 41/100, Ery 4,15 Millionen, Leuko 3 400) in Abb. 6 gruppiert sich der überwiegende Zellanteil um einen mittleren DNS-Gehalt auf der Abszisse mit einem 2c-DNS-Gehalt, nur wenige Zellen sind bei steigendem DNS-Gehalt vorhanden, sie weisen einen 2c-4c-DNS-Gehalt auf.

C. Auswertung der Histogramme

Den 2c-Wert auf der Abszisse liefert die Senkrechte durch den arithmetischen Mittelwert des G_1-Maximums. Vom ersten Einsatzpunkt des Linienschreibers bis zum 2c-Wert wird die Strecke abgemessen. Verdoppelt man diese Strecke, so erhält man den 4c-Wert auf der Abszisse. Die Abgrenzung der G_1-Phase gegenüber der S-Phase erfolgt graphisch an der Stelle, wo die Tangen-

Tab. 1: Klinisch- hämatologische Befunde und quantitativ-cytochemische DNS-Messungen nach Impulscytophotometrie an Knochenmarkpunktaten bei Hämoblastosen und Tumoren

Diagnose	Fall-zahl	Zellz. 1000/ ml	Rote Vor-st.%	Myelobl.+ Promy.+ Myeloc.%	% Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt Gesamt	S_1^+	S_2^+	S_3^+	G_2^+	Ery Mill. /ml	Reti o/oo	Leuko 1000/ ml	LDH IE
Akute Leukämie	9	144	19	60	13	23	25	28	25	3,20	17	8,2	570
Chron. myel. Leukämie	4	559	7	28	11	23	28	27	22	3,73	44	109,0	957
Sarko-matosen	8	63	29	10	10	26	25	31	19	3,73	19	6,6	315
Plasmo-cytom	7	98	22	14	10	25	25	27	23	3,53	10	4,6	153
Morbus Hodgkin	8	75	22	14	12	26	24	28	22	4,19	31	6,3	194
Morbus Walden-ström	4	171	11	10	8	23	24	33	20	4,11	12	5,6	167
Metasta-sierende Carcinome	9	82	21	12	10	29	26	26	20	4,39	6	6,8	246

+) Prozentuale Aufteilung des Gesamtzellanteils mit erhöhtem DNS-Gehalt in S_1 = frühe S-Phase, S_2 = mittlere S-Phase, S_3 = späte S-Phase und G_2-Phase.

Tab. 2: Klinisch- hämatologische Befunde und quantitativ cytochemische DNS-Messungen nach Impulscytophotometrie an peripheren Blutproben bei Hämoblastosen

Diagnose	Fall-zahl	Leuko 1000/ ml	Blasten u. Pro-myel.%	% Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt					Ery Mill. /ml	Reti °/oo	LDH IE
				Gesamt	S_1 +)	S_2 +)	S_3 +)	G_2 +)			
Akute Leukämie	10	36	57	6	23	23	30	24	2,91	21	404
Sarko-matosen	4	47	78	5	22	21	36	21	3,02	49	191
Chron. myel. Leukämie	5	98	11	8	26	26	27	21	3,27	20	776

+) Prozentuale Aufteilung des Gesamtzellanteils mit erhöhtem DNS-Gehalt in S_1 = frühe S-Phase, S_2 = mittlere S-Phase, S_3 = späte S-Phase und G_2-Phase.

Tab. 3: Klinisch-hämatologische Befunde und quantitativ cytochemische DNS-Messungen nach Impulscytophotometrie an Knochenmarkpunktaten bei Thrombopenie und Panmyelopathie

Diagnose	Fall-zahl	Zellz. 1000/ ml	Rote Vor-st.%	Myelobl.+ Promy.+ Myeloc.%	% Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt Gesamt	S_1^+	S_2^+	S_3^+	G_2^+	Ery Mill. /ml	Reti o/oo	Leuko 1000/ ml	LDH IE
Thrombo-penie	5	76	18	17	15	21	20	37	24	4,43	18	9,1	165
Panmyelo-pathie	13	141	28	13	14	27	27	26	19	3,64	27	4,4	257

+) Prozentuale Aufteilung des Gesamtzellanteils mit erhöhtem DNS-Gehalt in S_1 = frühe S-Phase, S_2 = mittlere S-Phase, S_3 = späte S-Phase und G_2-Phase.

Tab. 4: Klinisch- hämatologische Befunde und quantitativ cytochemische DNS-Messungen nach Impulscytophotometrie an Knochenmarkpunktaten bei Störungen der Erythropoese

Diagnose	Fall-zahl	Zellz. 1000/ ml	Rote Vor-st.	Myelobl.+ Promy.+ Myeloc.%	% Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt Gesamt	S_1^+	S_2^+	S_3^+	G_2^+	Ery Mill./ml	Reti o/oo	Leuko 1000/ ml	Sid. bl. %	PAS %	LDH IE
Frische Blutung	2	120	39	12	13	27	27	27	20	1,77	105	10,0	20	3	198
Fe-Mangel-+Blutungs-anämie	6	102	27	9	16	26	25	31	19	3,43	44	5,9	24	1	157
Thalass-ämie	2	360	57	8	13	27	24	27	22	4,40	20	5,3	61	3	443
Perni-ciosa[++)]	1	300	79	-	17	29	18	24	29	0,96	-	7,5	61	3	282
Anämie bei Le-bercirrh.	4	50	23	15	15	27	26	28	19	3,29	25	4,9	-	-	210
Anämie bei Urämie	38	-	16	12	10	28	27	26	19	2,36	25	4,9	26	5	146
Poly-cythämie	3	111	37	12	13	25	27	29	20	6,33	15	14,2	8	5	292
Polyglo-bulie	1	106	19	17	10	26	26	32	16	6,27	5	4,2	4	-	227

[+)] Siehe Fußnote Tab. 1

[++)] 3 Tage nach 1000 Gamma Vit. B_{12}

tensteigung sich Null nähert. Eine sichere Abgrenzung zwischen S- und G_2-Phase ist graphisch nicht möglich. Statt dessen wurde versucht, die Zellen der S- und G_2-Phase mit zunehmendem DNS-Gehalt willkürlich in 4 gleich große Abschnitte, bezogen auf die Abszisse, zu zerlegen (frühe-, mittlere-, späte S-Phase und G_2-Phase). Planimetrische Bestimmung des prozentualen Zellanteils in S- und G_2-Phase. Prozentuale Aufteilung des S- und G_2-Anteils entsprechend der relativen Höhenänderung dieses Anteils.

D. Der Zellanteil in S- und G_2-Phase

Beim Gesunden ist im Sternalpunktat der Anteil der Zellen in S- und G_2-Phase abhängig vom Ausmaß der Proliferation, in einer Blutprobe sind keine S- und G_2-Zellen nachweisbar. Abb. 5 zeigt ein typisches Histogramm eines gesunden Probanden mit einem normalen Differentialblutbild.

Im Gegensatz dazu tritt bei Hämoblastosen ein wechselnd großer Anteil S- und G_2-Phase Zellen in der Blutprobe auf, da proliferierende Zellen in der Blutbahn vorhanden sind (Tab. 2).

Vergleicht man den S- und G_2-Anteil im Sternalpunktat und in der Peripherie, so ist er im Sternalpunktat größer (Tab. 1).

Den bei Hämoblastosen erhobenen Befunden werden in Tab. 3 und 4[+)] Untersuchungsergebnisse bei Störungen der Erythropoese, bei Panmyelopathie und Thrombocytopenie gegenübergestellt.

[+)] Bei Tab. 4 wurde zusätzlich der Anteil der Sideroblasten und der PAS-positiven Erythroblasten angegeben.

Es ist auffallend, daß der Anteil aller S- und G_2-Phase Zellen, bezogen auf die Gesamtzahl der Knochenmarkszellen, keine ausgeprägten Unterschiede aufweist. Bezieht man ihn dagegen nur auf teilungsfähige weiße - und rote Vorstufen und leukämische Zellen, so ist der Zellanteil in S- und G_2-Phase bei Leukämien wesentlich geringer, als bei anderen Krankheitsbildern.

E. Zellverteilung in den einzelnen Abschnitten der S- und G_2-Phase

Die Zellzahl in den einzelnen Abschnitten der S- und G_2-Phase ist umgekehrt proportional der Geschwindigkeit der DNS-Reduplikation. Deutliche Unterschiede in dem Anteil der Zellen in den einzelnen Abschnitten der S- und G_2-Phase lassen sich bei keinem der aufgeführten Krankheitsbildern erfassen (Tab. 1-4). Jedoch ist der Anteil der G_2-Phase Zellen nach der perniciösen Anämie bei den Leukämien am höchsten. Leider konnten wir im Untersuchungszeitraum keinen Patienten mit unbehandelter megaloblastärer Anämie beobachten. Eine Patientin kam 3 Tage nach einer Injektion von 1000 Gamma Vitamin B_{12} zur Untersuchung, sodaß die megaloblastären Veränderungen zum Teil schon zurückgebildet waren.

F. Befunde unter cytostatischer Therapie

Viele cytostatische Substanzen greifen während der Phase der DNS-Reduplikation ein. Ein geeignetes Modell zur Erfassung von Veränderungen im Ablauf der DNS-Synthese-Phase stellen Tumoren mit hoher Proliferationsrate dar. So läßt Abb. 7 deutlich die Änderung der S-Phase Zellen bei der malignen Permanentlinie BICR/M1R_K nach einem 10-stündigen Block mit Hydroxyurea erkennen.

Schwieriger ist die Erfassung von Veränderungen der S-Phase Zellen in peripheren Blut- und Knochenmarksproben während einer cytostatischen Therapie beim Menschen, da insbesondere Leukämiezellen eine niedrige Proliferationsrate zeigen (Tab. 5).

Tab. 5: Zellanteil in S- und G_2-Phase bezogen auf teilungsfähige Knochenmarkszellen.

Diagnose	Fallzahl	% Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt
Akute Leukämien	9	17
Anämien	53	35

Mehrfache Sternalpunktionen in kurzen Abständen lassen sich nicht durchführen. So mußten Kontrolluntersuchungen in der Regel an peripheren Blutproben erfolgen.
Weiterhin wird die Aussagekraft der Untersuchungen dadurch eingeschränkt, daß nicht alle Untersuchungen zur gleichen Zeit nach Cytostatikagabe durchgeführt werden konnten.
Wir stellten fest, daß nach Mylerandauertherapie (Abb.8), nach ARA-C Gabe (Abb.9), nach Teilsynchronisation mit Hydroxyurea (Abb. 11), bei einer Kombinationstherapie mit dem Alkaloid Vincristin (Abb. 13) und bei mehrfachen Milzbestrahlungen (Abb. 14) oft schon vor dem Abfall der Gesamtleukocytenzahl, der Zellanteil in der S-Phase stärker abnahm, als der Prozentsatz teilungsfähiger Zellen, als Zeichen einer Hemmung der Zellproliferation.
Bei der Kombinationstherapie von ARA-C und Thioguanin (Abb. 10) und bei St in Abb. 12 unter einer Adriamycintherapie stieg der Zellanteil mit erhöhtem DNS-Gehalt an, obwohl sich die Leukocytenzahlen verringerten.

Eine sichere Verschiebung des jeweiligen Zellanteils in früher-, mittlerer- und später S-Phase läßt sich (Abb. 15 und 16) nicht erfassen.

IV. Diskussion

Die durchgeführten impulscytophotometrischen DNS-Untersuchungen zeigen eine Häufigkeitsverteilung der DNS-Mengen in den untersuchten Zellen des Knochenmarks und der Blutperipherie. Die gewonnenen Ergebnisse lassen sich jedoch nicht auf einzelne Zellgruppen beziehen, sie stellen vielmehr einen Mittelwert aller in einer Probe enthaltenen kernhaltigen Zellen dar. Die Proben, die nur teilungsunfähige Zellen (wie in einem normalen peripheren Blut) enthalten, zeigen in allen Zellen einen etwa gleichen fluoreszenzphotometrisch erfaßbaren DNS-Gehalt mit einer Halbwertsbreite, die etwa bei einem Fünftel des Mittelwertes liegt. In Proben mit teilungsfähigen Zellen wie Knochenmarksproben, oder periphere Blutproben mit einer Ausschwemmung unreifer Zellen, weist die Mehrzahl der Zellen ebenfalls einen etwa gleichen DNS-Gehalt wie teilungsunfähige Zellen auf. Daneben finden sich aber noch mehr oder weniger viele Zellen, die einen höheren bis zum doppelten des Ausgangswertes erhöhten DNS-Gehalt zeigen.

Folgende Deutungen sind für diese zuletzt genannten Befunde möglich:
1. Es handelt sich um Zellen mit einem veränderten DNS-Gehalt etwa infolge eines pathologischen Chromosomenmusters (RIS und MIRSKY 1949, MÜLLER et al. 1971).
2. Es handelt sich um Zellen, die eine prämitotische DNS-Reduplikation durchmachen.
Die unter 1. genannte Ursache dürfte gegenüber einer DNS-Synthese in der Regel selten sein.
Alle gewonnenen Ergebnisse beziehen sich auf sämtliche in einer Probe enthaltenen Zellen. Eine Interpretation ist im Vergleich zur Untersuchung einzelner morphologisch definierter Zellen in zwei Richtungen möglich:
1. Die Probe enthält überwiegend Zellen einer einzigen Zellpopulation. Dies ist zum Beispiel der Fall bei

Leukämien mit einem hohen Blastenanteil. Hier kann das Ergebnis mit Vorsicht auf die leukämische Zellpopulation bezogen werden.
2. Bestimmte Abläufe der DNS-Synthesephase werden in verschiedenen Reifungsstufen (Myeloblast, Promyelocyt, Myelocyt) wie in verschiedenen Zellinien (Erythropoese, Granulopoese) in gleicher Weise erwartet. Dann lassen sich generalisierte Störungen des Zellzyklus während der Blutzellreifung erfassen.

Die Ergebnisse der quantitativen DNS-Bestimmungen sind nach dem Schema G_0, G_1 - S - G_2 zu interpretieren, wobei die Zellen der G_0- und G_1-Phase einen 2c-, der S-Phase einen 2c - 4c- und der G_2-Phase einen 4c-DNS-Gehalt aufweisen. Der Anteil der Zellen in den einzelnen Compartments ist proportional der Dauer in der die einzelnen Phasen durchlaufen werden. Dies gilt in gleicher Weise auch für den Ablauf der DNS-Reduplikation selbst, sodaß ein unterschiedlicher Zellanteil mit gering über dem 2c-Wert erhöhten DNS-Gehalt und nahezu verdoppelten DNS-Gehalt auf eine unterschiedliche DNS-Synthesegeschwindigkeit am Beginn und am Ende der DNS-Reduplikation hinweist. Mit der großen Halbwertsbreite des G_0- bzw. G_1- Peaks mit einem 2c- DNS-Gehalt ist jedoch eine recht große Streubreite verbunden, die den Vorteil, die Ergebnisse aus einer großen Zahl von Zellen gleichzeitig zu erfassen, zum Teil wieder wettmacht. Infolge einer unterschiedlich großen Streubreite bei gleichzeitig sehr niedrigem Anteil an S-Phase Zellen sind bis jetzt die Versuche einer genauen mathematischen Analyse fehlgeschlagen. Die von uns versuchte graphische Aufteilung der Zellgruppen mit einem DNS-Gehalt über dem 2c-Wert kann deshalb nur eine Annäherung darstellen, die dem Versuch dient, grobe Unterschiede in dem Muster der DNS-Reduplikation bei verschiedenen Störungen der Hämatopoese zu erfassen.

Die vorliegenden Untersuchungen basieren auf cytophoto-

metrischen Befunden, wonach zum Beispiel bei der megaloblastären Anämie eine ausgeprägte Vermehrung der G_2-Phase Zellen durch Blockierung der Mitose vorliegt (FITZGERALD et al. 1966, WAKISAKA et al. 1966, BOCK et al. 1967) und wesentlich geringer ausgeprägt auch bei manchen Formen von sideroachrestischen Anämien (MÜLLER et al. 1969, HUBER et al. 1972). Da infolge des großen arbeitstechnischen Aufwandes alle cytophotometrischen Untersuchungen immer nur Einzelbefunde darstellen, schien es von Bedeutung, an einem größeren Krankengut festzustellen, ob tatsächlich Störungen der Zellneubildung bei den verschiedenen Krankheitsgruppen entweder durch Vermehrung der G_0-Zellen bzw. Blockierung in der G_1-Phase oder Arretierung in der G_2-Phase auftreten können und ob sich solche mit der Impulscytophotometrie wie mit der Cytophotometrie erfassen lassen. Alle mit dieser Technik untersuchten Krankheitsgruppen zeigen ein nahezu gleiches Muster im Ablauf des Zellzyklus mit einem hohen G_0- bzw. G_1-Zellanteil. Eine ausgeprägte Häufung von G_2-Phase Zellen findet sich nur bei einem Patienten mit bereits anbehandelter megaloblastärer Anämie. Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß sich unter den von uns untersuchten Kranken kein Fall mit einer ausgeprägten, unbehandelten perniciösen Anämie oder mit einer schweren sideroachrestischen Anämie befand.
Auch die von uns untersuchten S-Phasen-spezifischen Cytostatika führten zu keinem mit unserer Methodik eindeutig erfaßbaren Verschiebungen im Zyklusablauf in den von uns gewählten Untersuchungszeiten. Dagegen fand sich unter Cytostatika, abhängig von dem Zeitpunkt der Untersuchung, eine zum Teil eindeutige (Fall St, Abb. 15) Abnahme der Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt, als Zeichen einer herabgesetzten DNS-Synthese (WILMANNS und HARTJE 1970), die nicht durch eine Änderung des Anteils teilungsfähiger Zellelemente, in diesem Fall leukämischer Blasten, bedingt bzw. zu erklären war.

Setzt man bei allen untersuchten Knochenmarkspunktaten den Anteil der Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt in Beziehung zur Zahl der teilungsfähigen Zellen, so zeigt sich, daß bei Leukämien prozentual weniger teilungsfähige Zellen einen erhöhten DNS-Gehalt aufweisen wie in Sternalmarkausstrichen, die nur normale rote und weiße Blutzellvorstufen enthalten (KILLMANN 1965). Nimmt man an, daß es sich bei den Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt um solche in S- und G_2-Phase handelt, so bedeutet das, daß sich bei akuten Leukämien mehr Zellen in der G_1- bzw. G_0-Phase befinden, als in normalen Blutzellpopulationen. Das weist entweder auf einen verlängerten Generationszyklus leukämischer Zellen, einen erhöhten Anteil der G_0-Zellen (resting cells), oder auf das gemeinsame Vorliegen beider Störungen hin. Die vorliegenden Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den bisher in der Literatur hierzu mitgeteilten Beobachtungen. (GAVOSTO et al. 1959, GAVOSTO 1960, KILLMANN et al. 1961, MAUER und FISHER 1962, MAUER und FISHER 1963, GAVOSTO et al. 1964, KILLMANN 1968, GAVOSTO et al. 1968).

Um die Aussagefähigkeit der Methode zu überprüfen, wurden bei 35 Fällen die Ergenisse gleichzeitig durchgeführter feulgenphotometrischer DNS-Untersuchungen +) herangezogen. Abb. 17-19 zeigen die gute graphische Übereinstimmung feulgenphotometrisch und impulscytophotometrisch gewonnener Histogramme.
Bei den feulgenphotometrischen Untersuchungen wurde, um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen, der DNS-Gehalt von 100 bzw. 200 kernhaltigen Blutzellen bestimmt, die bei mäanderförmiger Abrasterung der Präparate zur Beobachtung kamen. Bei dem Vergleich ist zu berücksichtigen, daß die Verteilung der teilungs- und

---

+) Für die Überlassung der Untersuchungsergebnisse danke ich Herrn Privatdozent Dr. Müller

Tab. 6: Zellzahl (%) mit erhöhtem DNS-Gehalt (S- und G_2-Phase) nach Impulscytophotometrie und Feulgenphotometrie.
Unter Berücksichtigung der statistischen Verteilung der Zellen zeigen nur 3 Patienten (++) signifikante Unterschiede.

Name	Datum (1971)	Diagnose	Impulscytophotometrie	Feulgenphotometrie
We	16.3.	Akute Leukämie	2,6	2
We	18.3.	"	5,0	4
Ho	16.3.	"	22,0	21
Ho	18.3.	"	8,6	3
Ho	19.3.+)	"	12,2	5
Lo	13.5.+)	"	13,3	2
Lo	13.5.+)	"	5,8	1
Lo	14.5.	"	4,3	2
Lo	15.5.	"	8,5	9
Lo	17.5.	"	8,5	4
Lo	19.5.	"	6,6	1
Lo	20.5.	"	13,0	1
Lo	21.5.	"	10,7	1
Lo	22.5.	"	9,1	8
Tü	30.3.	Panmyelopathie	19,2	25
St	24.5.	"	19,0	32
Ke	7.6.	"	18,2	20
Mä	7.6.	"	9,1	15
Me	7.6.	"	8,0	10
Be	8.6.	"	14,1	5
Ka	8.6.	"	9,2	15
Vo	8.6.	"	14,6	18
Mü	11.6.	"	22,5	20
Ar	14.6.	"	14,6	22
El	24.3.	M. Werlhoff	15,3	1++)
Alt	24.3.	M. Hodgkin	14,3	14
Alb	31.3.	"	20,0	23
Gr	26.3.	Anämie	12,0	36
Le	29.3.	"	15,0	10
En	4.6.	"	17,9	53++)
He	23.3.	Brill Symmers	14,1	20
St	18.3.	Lebercirrhose	22,8	21
Hä	29.3.	Osteoporose	12,1	21
Mü	25.3.	Urticaria	16,7	1++)

+) Blutentnahme zu verschiedenen Tageszeiten

Messung von 7 000 - 80 000 Zellen bei Impulscytophotometrie, 100 - 200 Zellen bei Feulgenphotometrie.

nicht teilungsfähigen Blutzellen in der Stichprobe nur mit einer erheblichen Streubreite der zu Grunde liegenden wahren Verteilung entspricht. Die 2 Sigmabreite liegt bei 30 % teilungsfähiger Zellen und einer Gesamtzahl von 200 Zellen zwischen 24 und 37 %.

In Tab. 6 ist der graphisch ermittelte Anteil von Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt nach Feulgenphotometrie mit dem Zeiss-Cytophotometer UMSP I und nach Impulscytophotometrie gegenübergestellt. Unter der Voraussetzung einer gleichen Zellverteilung sind dabei in 20 Proben die Ergebnisse übereinstimmend. In 15 Fällen sind die Werte dagegen signifikant verschieden. Berücksichtigt man die statistische Streuung teilungsfähiger Zellen bei den Stichproben, bleibt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Ergebnissen nur für 3 Fälle bestehen, die der Methodik zur Last gelegt werden müssen. Ob diese Zahl größer würde, wenn die feulgenphotometrisch erfaßte Stichprobe größer gewesen wäre, muß offengelassen werden. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß zwar erhebliche methodische Fehler vorliegen können, daß im Regelfall aber eine Auswertung der Ergebnisse berechtigt ist.

An 55 Proben (Tab. 7) wurden zum gleichen Zeitpunkt ^{3}H-Thymidin-autoradiographische Untersuchungen durchgeführt[+]. Hierdurch kann der Anteil der Zellen, die den DNS-Vorläufer Thymidin einbauen mit Zellen, die sich an Hand ihres erhöhten DNS-Gehaltes nach Impulscytophotometrie in DNS-Synthese befinden dürften, miteinander verglichen werden. Unter Berücksichtigung der statistischen Zellverteilung lag in 10 Fällen der Zellanteil mit erhöhtem DNS-Gehalt und der ^{3}H-Thymidinindex innerhalb der Signifikanzschranken und zwar bei 2 Kranken mit akuter Leukämie, bei 1 Kranken mit Sarkom, bei 2 Kranken mit Pan-

---

[+] Für die Überlassung der Untersuchungsergebnisse danke ich Herrn Dr. Lang und Herrn Privatdozent Dr. Müller.

Tab. 7: Zellzahl (%) mit erhöhtem DNS-Gehalt (S- und G_2-Phase) nach Impulscytophotometrie und Markierungsindex (%) nach ^{3}HT-Autoradiographie bei 55 Vergleichsuntersuchungen an 39 Patienten.
Auch unter Berücksichtigung der statistischen Verteilung der Zellen differieren die Befunde der 2. Gruppe signifikant ($p = 0,05$). Mit Ausnahme von 3 Fällen (++) ist stets der ^{3}HT-Index niedriger.

I.

Name	Datum (1971)	Diagnose	Impulscyto-photometrie	^{3}HT-Auto-radiographie
Lo	14.5.	Akute Leukämie	1,6	3,4
He	19.5.	"	11,0	12,4
Lä	18.5.	Sarkom	7,3	9,5
Ma	8.6.	Panmyelopathie	9,6	9,7
Dr	9.6.	"	15,6	14,7
Ha	7.6.	M. Hodgkin	7,1	6,7
Bo	11.6.	Urämie	7,1	5,9
Ho	11.6.	"	6,4	5,3
Ol	11.6.	"	6,6	5,2
Zi	11.6.	"	6,2	7,8

Messung von 2 000 - 80 000 Zellen bei Impulscytophotometrie, Auszählung von 1 000 - 6 000 Zellen nach Autoradiographie.

II.

Name	Datum (1971)	Diagnose	Impulscyto-photometrie	^{3}HT-Auto-radiographie
Pa	10.3. +)	Akute Leukämie	13,6	2,2
Pa	10.3.	"	13,6	8,5
Pa	10.3.	"	13,6	4,6
Pa	10.3.	"	13,6	4,4
Pa	10.3.	"	12,2	6,1
Pa	10.3.	"	20,4	4,6
Pa	11.3.	"	13,6	2,8
Ho	16.3. +)	"	22,0	10,9
Lo	13.5.	"	11,7	1,5
Lo	13.5.	"	12,2	0,2
Lo	13.5.	"	9,6	0,1
Lo	13.5.	"	8,8	0,1
Lo	13.5.	"	6,7	0,2
Lo	13.5.	"	8,4	0,2
Lo	13.5. +)	"	4,6	1,5
Lo	14.5.	"	3,2	1,7
Lo	14.5.	"	4,6	0,9
Lo	14.5.	"	6,0	2,8
St	21.5.	Panmyelopathie	19,0	7,9
Be	7.6.	"	14,6	6,6
Ke	7.6.	"	18,2	6,4
Le	7.6.	"	17,0	10,9
Me	7.6.	"	9,1	6,4
Me	7.6.	"	8,0	14,7 ++)
Vo	7.6.	"	14,6	6,8
Ka	8.6.	"	9,2	4,5
Mü	9.6.	"	22,5	10,1
Ar	14.6.	"	14,6	8,2
De	11.6.	Urämie	13,5	4,2
Gr	11.6.	"	4,7	7,7 ++)
Sch	11.6.	"	5,9	3,4
Stro	11.6.	"	11,2	7,0
Vo	11.6.	"	8,9	2,6
Stre	14.6.	"	9,2	5,6
Ko	16.6.	"	17,3	6,1
We	16.6.	"	10,8	4,0
Ba	17.6.	"	9,3	1,1
Ho	17.6.	"	13,8	7,6
Kl	17.6.	"	10,8	8,1
Schn	17.6.	"	7,4	2,2
Scho	17.6.	"	7,9	3,7
St	17.6.	"	9,6	5,9
Tr	17.6.	"	13,0	4,0
Sz	17.6.	"	12,6	7,2
Va	17.6.	"	6,0	9,9 ++)

+) Blutentnahme zu verschiedenen Tageszeiten

myelopathie, bei 1 Kranken mit M. Hodgkin und bei 4 Kranken mit Urämie.
In 3 Fällen lag der ^{3}H-Thymidinindex auch unter Berücksichtigung der statistischen Verteilung der Zellen signifikant über dem Zellanteil mit erhöhtem DNS-Gehalt nach Impulscytophotometrie.
Bei 42 der 55 untersuchten Blut- und Knochenmarksproben ist der Zellanteil mit erhöhtem DNS-Gehalt signifikant höher, als der Zellanteil, der ^{3}H-Thymidin als Zeichen der stattfindenden DNS-Synthese in die Kern-DNS einbaut. Dies gilt auch unter Berücksichtigung der Zellverteilung, und wenn man annimmt, daß ein Sechstel aller Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt sich in der G_2-Phase befindet, was einer Dauer von S- : G_2-Phase wie 5 : 1 entspricht, und kein ^{3}H-Thymidin mehr einbaut (FLIEDNER et al. 1962, STRYCKMANS et al. 1966).
Setzt man diese Ergebnisse zu den untersuchten Krankheitsgruppen in Beziehung, so liegt bei 18 Untersuchungen bei akuter Leukämie, bei 9 von 10 Untersuchungen bei Panmyelopathie und bei 15 von 17 Untersuchungen bei Urämie der ^{3}H-Thymidinindex niedriger als der impulscytophotometrisch bestimmte Zellanteil mit erhöhtem DNS-Gehalt. Nur in einem Teil der Fälle kann diese Diskrepanz der Methode zur Last gelegt werden. Die Annahme, daß die impulscytophotometrisch gewonnenen Werte methodisch bedingt zu hoch liegen, läßt sich bei dem Vergleich cytophotometrischer und impulscytophotometrischer Ergebnisse nicht bestätigen. Es muß deshalb eine biologische Deutung der Befunde versucht werden. Durch gleichzeitige Chromosomenuntersuchungen [+)] (MÜLLER et al. 1971) konnte ausgeschlossen werden, daß es sich in diesen Fällen um Zellen mit einem pathologischen DNS-Gehalt und Chromosomenmuster handelt.
Eine verlängerte G_2-Phase könnte zwar den gegenüber dem

[+)] Für die Überlassung der Untersuchungsergebnisse danke ich Herrn Dr. Orywall vom Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen.

^{3}H-Thymidinindex vermehrten Zellanteil mit über dem 2c-Wert erhöhtem DNS-Gehalt erklären. Die DNS-Histogramme bieten aber keinen Hinweis dafür, daß in diesen Fällen vermehrt G_2-Zellen vorliegen. Deshalb glauben wir, daß ein Teil der Zellen, der sich auf Grund des erhöhten DNS-Gehaltes in S-Phase befinden müßte, aber kein ^{3}H-Thymidin mehr einbaut und damit keine weitere DNS mehr synthetisiert, nicht mehr im Zyklus steht. Es handelt sich damit um eine mehr oder minder ausgeprägte ineffektive Zellneubildung, wobei einzelne Zellen während der S-Phase aus dem Zyklus ausscheren. Solche Befunde wurden erstmals von FITZGERALD et al. (1966) und WAKISAKA et al. (1966) durch kombinierte feulgenphotometrische - und autoradiographische Untersuchungen bei der perniciösen Anämie und von HUBER et al. (1972) bei 3 Fällen von Panmyelopathie beobachtet. Die jetzt vorliegenden Befunde beweisen auch bei Berücksichtigung der ausgewerteten Zellzahlen und möglicher Verteilungsfehler, daß bei den akuten Leukämien wie bei vielen nichtleukämischen Blutbildungsstörungen mit einer ineffektiven Zellneubildung gerechnet werden muß.

Die Impulscytophotometrie eröffnet neue Möglichkeiten zur Beurteilung der Zellproliferation. In kurzer Zeit kann der DNS-Gehalt der Einzelzellen einer Blutzellsuspension mit tausenden von Zellen untersucht werden. Sind überwiegend Zellen einer einzigen Zellpopulation vorhanden oder liegt eine gemeinsame Störung in verschiedenen Zellinien vor, so lassen sich Störungen des Zellzyklus gut erfassen. Der Vergleich mit der Feulgenphotometrie zeigt, daß die methodisch bedingten Fehler gering sind. Die Gegenüberstellung der impulscytophotometrischen Befunde und des ^{3}H-Thymidin-Index weist auf neue Möglichkeiten in der Interpretation der Befunde.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die mit einem Impulscytophotometer fluoreszenzphotometrisch gewonnenen DNS-Bestimmungen vorgelegt.
Die Fehlerbreite der DNS-Messungen ist nach Färbung mit Akriflavin größer als nach Färbung mit Ethidium bromide.
Der relative DNS-Gehalt läßt sich in kurzer Zeit in mehreren 10 000 Zellen bestimmen. Die in einer Probe enthaltenen Zellgruppen sind jedoch nicht getrennt erfaßbar.
Deutet man die Ergebnisse nach dem Konzept G_0, G_1 - S - G_2 finden sich, bezogen auf den Anteil teilungsfähiger Blutzellen bei Leukämien die wenigsten Zellen in S- und G_2-Phase. Teilt man die Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt in mehrere Compartments mit unterschiedlichem DNS-Gehalt ein, lassen sich keine verschiedenen Abläufe der DNS-Synthesephase zwischen den untersuchten Krankheitsbildern erkennen. Auch unter Therapie mit S-Phasenspezifischen Cytostatika treten keine erfaßbaren Änderungen im Ablauf der S-Phase ein.
Der Vergleich mit feulgenphotometrischen DNS-Untersuchungen zeigt nur in wenigen Fällen einen signifikanten allein methodisch erklärbaren Unterschied zwischen den Ergebnissen. Bei vergleichenden ^{3}H-Thymidin autoradiographischen Untersuchungen finden sich bei den meisten akuten Leukämien und einem Teil der Panmyelopathien und Urämien in denselben Proben mehr Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt, als solche, die als Zeichen einer fortlaufenden DNS-Synthese ^{3}H-Thymidin aufnehmen. Dies weist auf eine ineffektive Zellneubildung bei diesen Kranken hin.
Die Impulscytophotometrie bietet damit die Möglichkeit den DNS-Gehalt der Einzelzelle in Zellsuspensionen zu bestimmen.

VI. Abbildungen

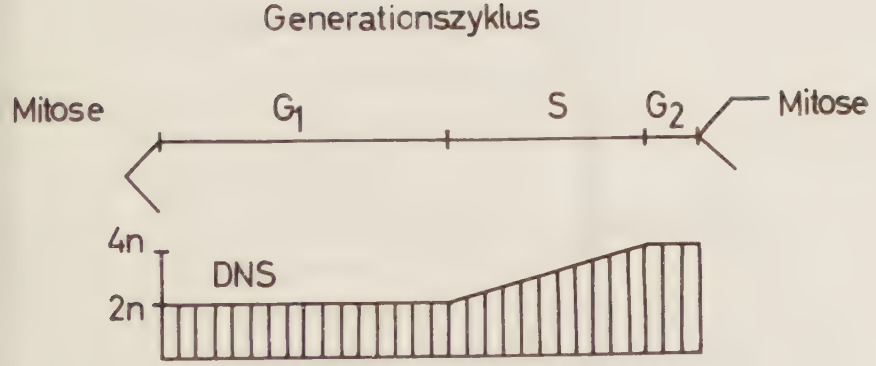

Abb. 1: Schematische Darstellung des Generationszyklus zwischen zwei Mitosen.
G_1 = postmitotische Ruhephase, der DNS-Gehalt des Zellkerns ist diploid (2n bzw. 2c).
S = DNS-Synthesephase, der DNS-Gehalt steigt an.
G_2 = prämitotische Ruhephase mit verdoppeltem DNS-Gehalt (4n bzw. 4c).

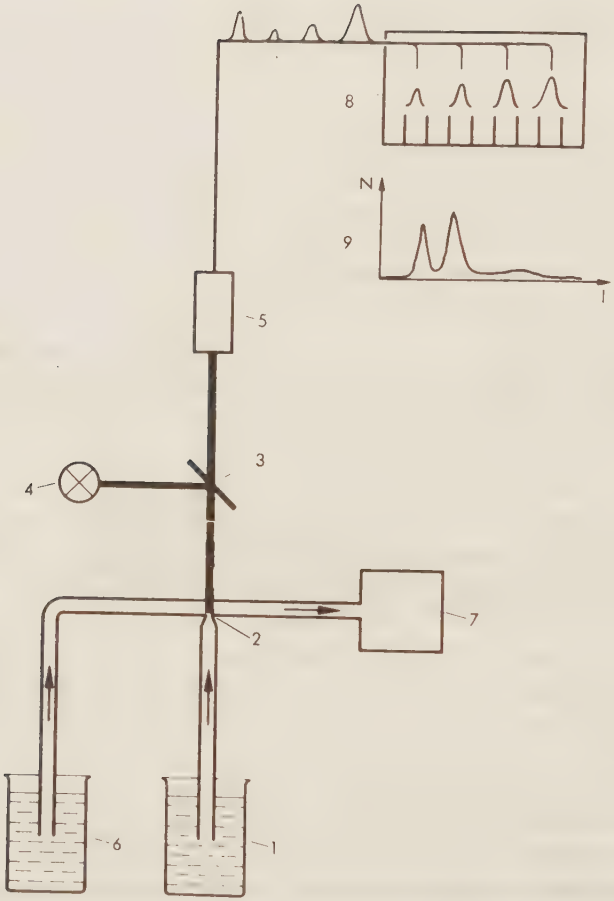

Abb. 2: Schematischer Aufbau des Impulscytophotometers ICP 11.

1 Zellprobe (max. Zellkonz. 30 000/ml)

2 Meßöffnung (d = 100 µ)

3 dichroitischer Spiegel

4 Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 100)

5 Photomultiplier (Photokathode mit S-20 Charakteristik)

6 Spülflüssigkeit (Aqua dest.)

7 Vakuumpumpe

8 Vielkanalanalysator (128 Kanäle, max. 99 999 Impulse pro Kanal)

9 Geschriebenes Histogramm

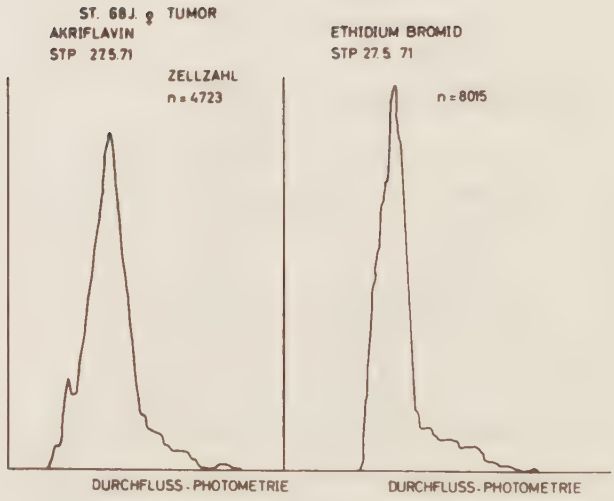

Abb. 3: Histogramme einer Zellsuspension nach Fluorochromierung mit Ethidium bromide bzw. Akriflavin.

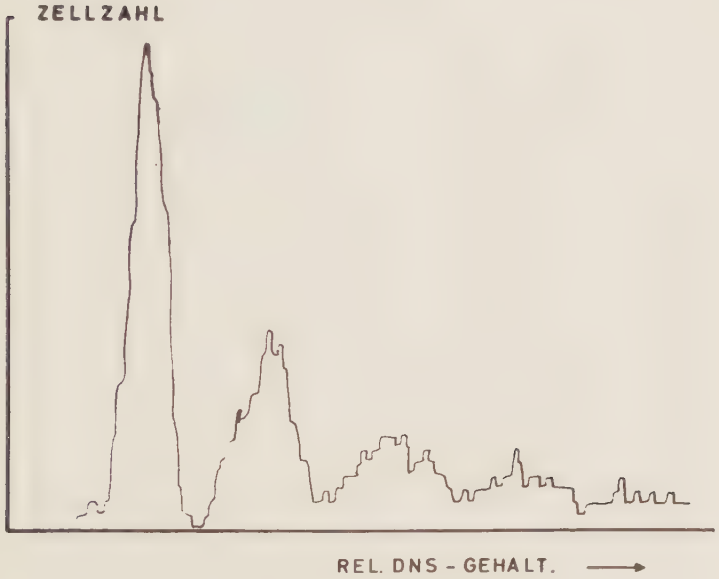

Abb. 4: Histogramm einer Blutzellsuspension ohne Ultraschallbehandlung. Dem Maximum mit der höchsten Amplitude folgen weitere, die durch Zellaggregation bedingt sind.

Abb. 5: Typisches Histogramm einer Blutprobe. Alle Zellen gruppieren sich um den 2c-DNS-Gehalt.

Abb. 6: Typisches Histogramm eines Knochenmarkpunktates. Viele Zellen gruppieren sich um den 2c-DNS-Gehalt, wenige Zellen weisen einen höheren DNS-Gehalt auf.

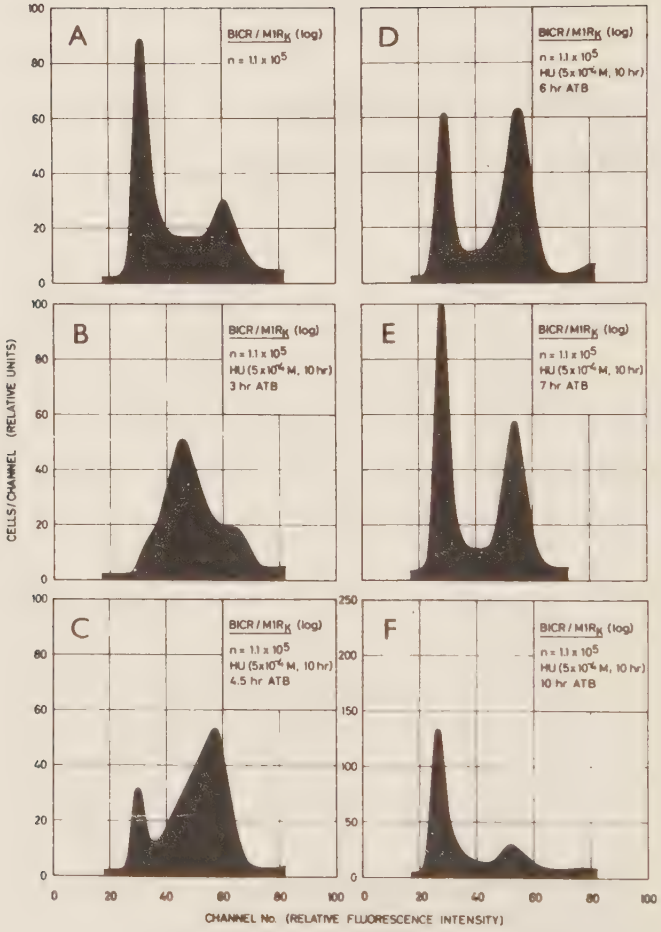

Abb. 7: Histogramme einer malignen Permanentlinie BICR/M1R$_K$ 10 Stunden nach Hydroxyureagabe (HU) und nach 3, 4, 5, 6, 7, 10 Stunden (hr) "Entblockung" (ATB). Deutliche Änderung innerhalb der S-Phase.

Nach A. GRÜNEISEN und M.F. RAJEWSKY, 1972, in Vorbereitung.

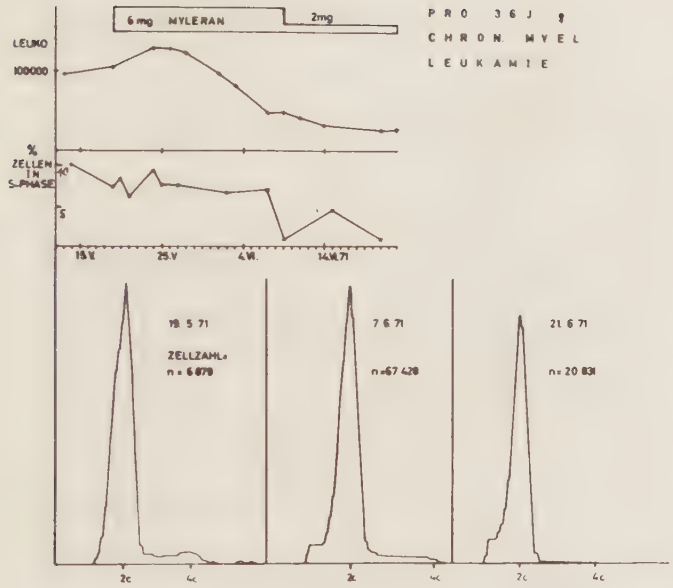

Abb. 8: Verlaufsuntersuchung bei chronisch myeloischer Leukämie mit 3 Histogrammen, die den Rückgang des Zellanteils mit erhöhtem DNS-Gehalt unter Mylerantherapie anzeigen.

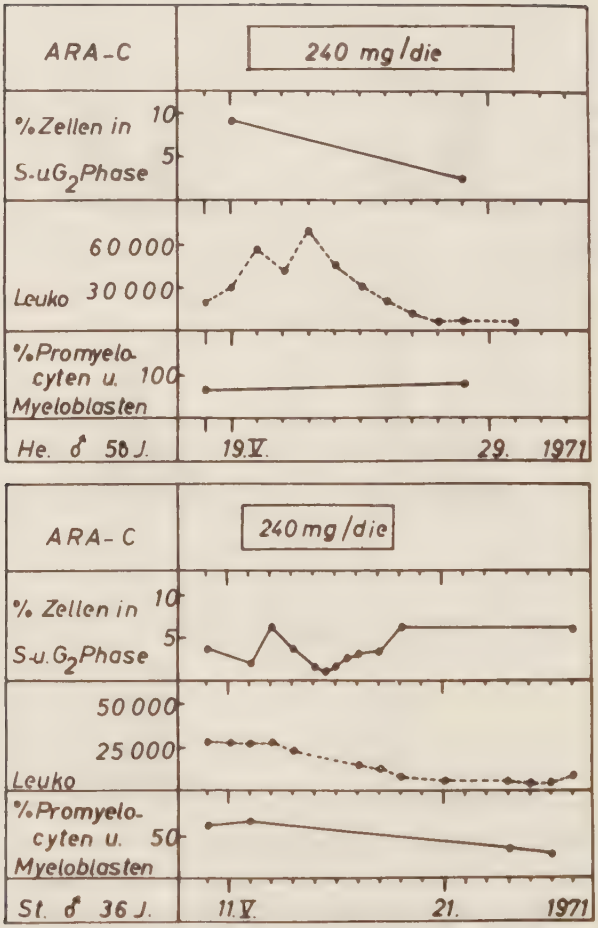

Abb. 9: Verlaufsuntersuchungen bei den Pat. He mit undifferenzierter Leukämie und St mit akuter myeloischer Leukämie unter Cytosinarabinosidtherapie. Der Zellanteil mit erhöhtem DNS-Gehalt fällt vorübergehend ab.

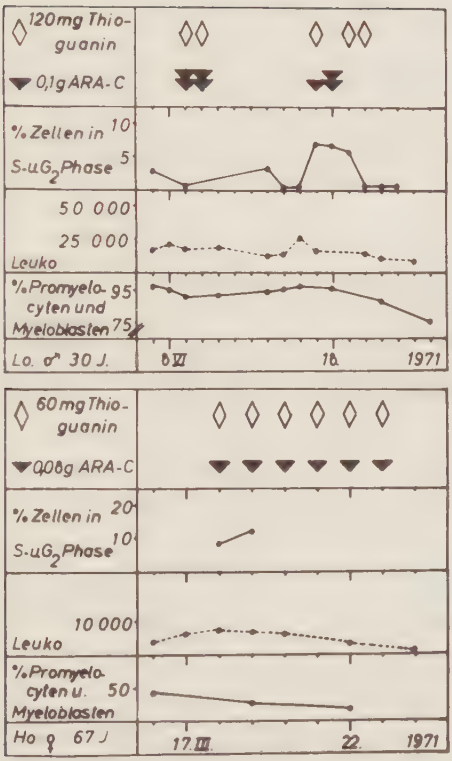

Abb. 10: Verlaufsuntersuchungen bei den Pat. Lo mit undifferenzierter Blastenleukämie und Ho mit Myeloblastenleukämie unter kombinierter Cytosinarabinosid- und Thioguanintherapie. Es ist kein typisches Verhalten der Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt zu erkennen.

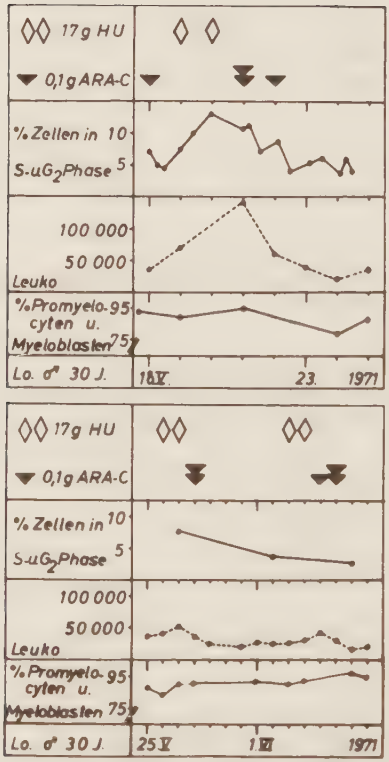

Abb. 11: Verlaufsuntersuchung bei Lo mit undifferenzierter Blastenleukämie bei Cytosinarabinosidgaben nach Teilsynchronisation mit Hydroxyurea. Der Zellanteil mit erhöhtem DNS-Gehalt sinkt jeweils vorübergehend ab.

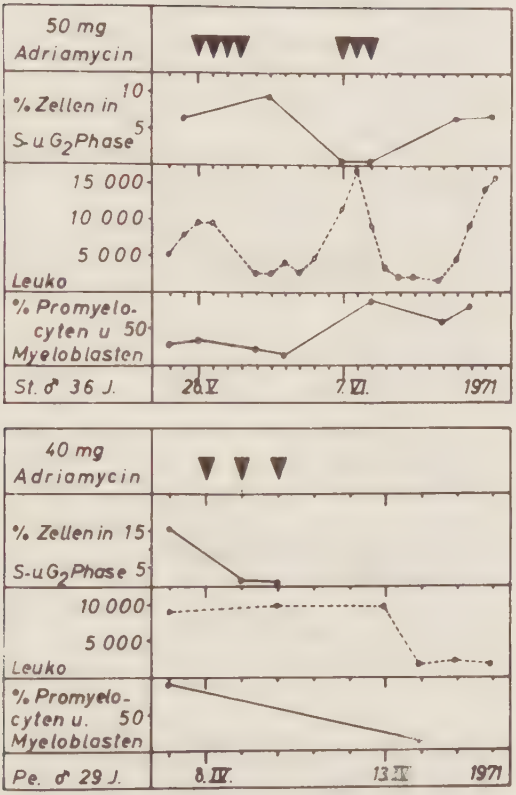

Abb. 12: Verlaufsuntersuchungen bei St und Pe mit akuter myeloischer Leukämie unter Adriamycintherapie. Bei Pe, der auf die Therapie anspricht, geht der Abfall des Zellanteils mit erhöhtem DNS-Gehalt dem Leukocytensturz voraus.

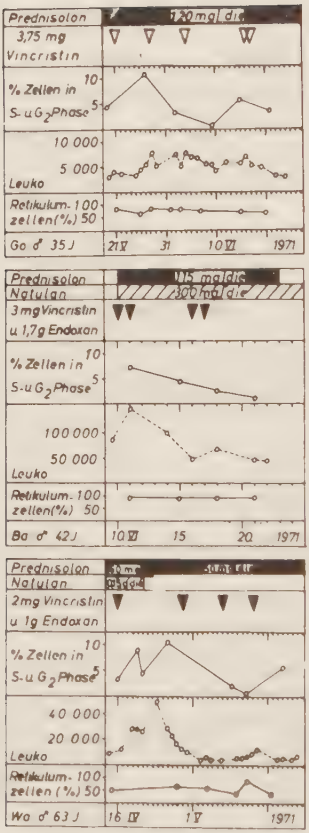

Abb. 13: Verlaufsuntersuchungen bei Gö, Ba und Wa mit Retikulose unter einer Kombinationstherapie mit Vincristin. Bei gleichbleibendem Prozentsatz an Retikulumzellen kommt es zunächst zur Abnahme des Zellanteils mit erhöhtem DNS-Gehalt und der Gesamtleukocytenzahl.

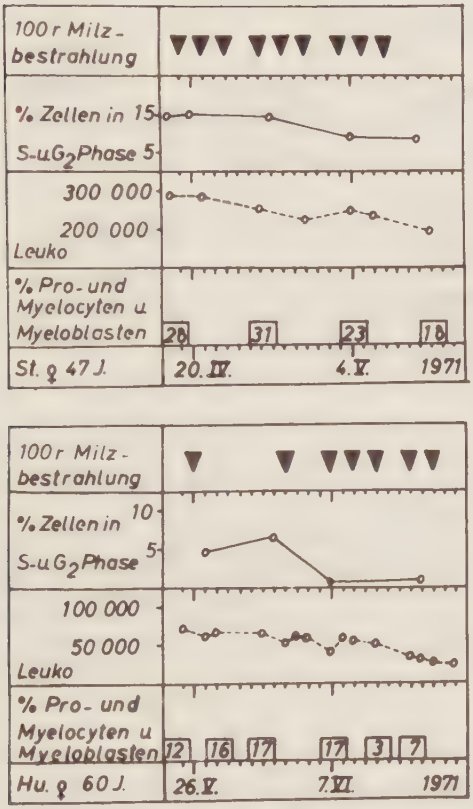

Abb. 14: Verlaufsuntersuchung bei chronisch myeloischer Leukämie während wiederholter Milzbestrahlungen. Der Zellanteil mit erhöhtem DNS-Gehalt, die Gesamtleukocytenzahl wie die Zahl der myeloischen Vorstufen fallen ab.

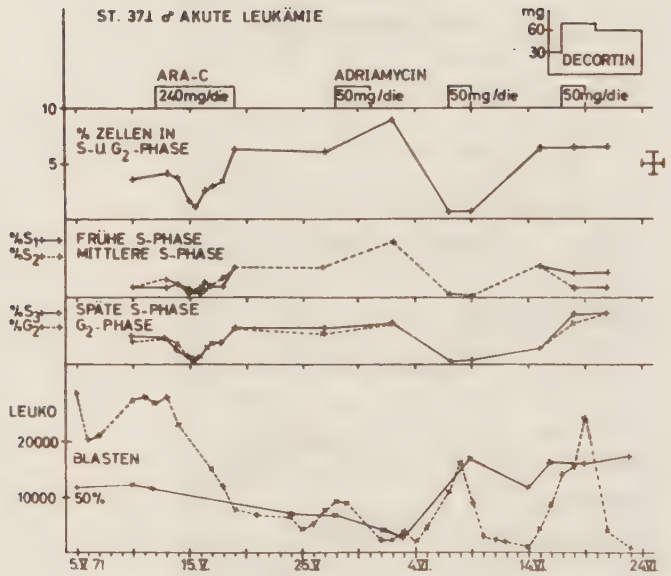

Abb. 15: Verlaufsuntersuchung bei akuter myeloischer Leukämie. Die Unterteilung der Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt in frühe-, mittlere-, späte S-Phase und G_2-Phase läßt keine sichere Verschiebung innerhalb der S-Phase erkennen.

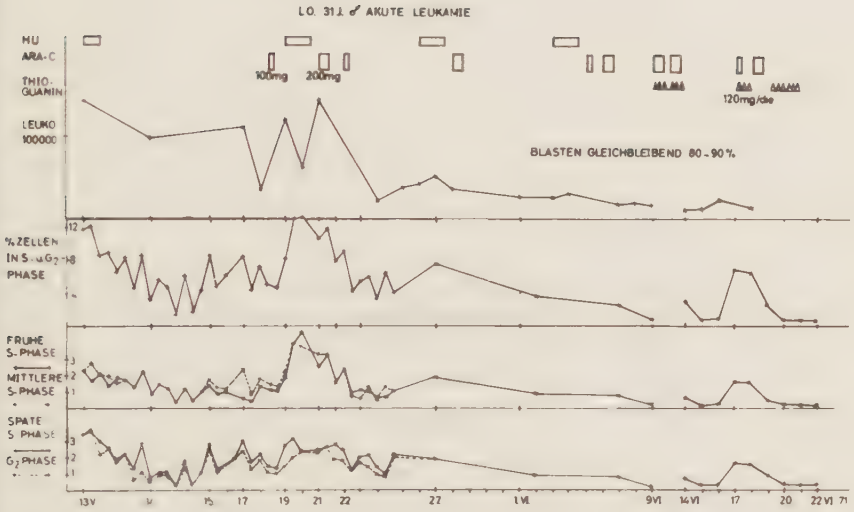

Abb. 16: Verlaufsuntersuchung bei undifferenzierter Blastenleukämie. Die Unterteilung der Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt in frühe-, mittlere-, späte S-Phase und G_2-Phase läßt keine sichere Verschiebung innerhalb der S-Phase erkennen.

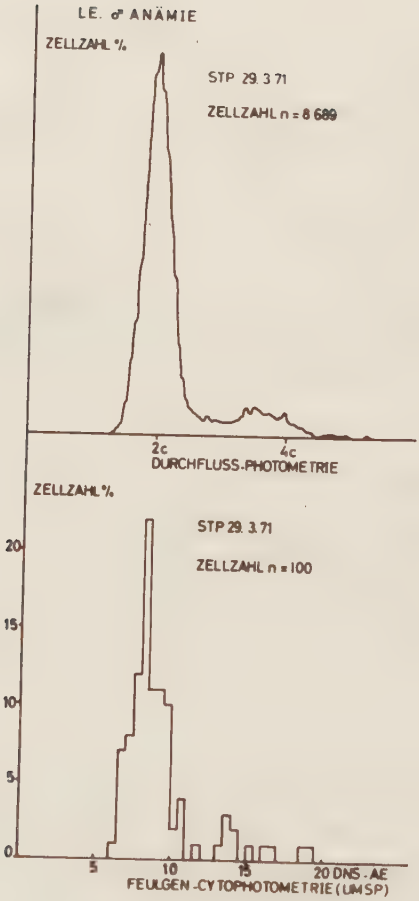

Abb. 17: Vergleichende DNS-Bestimmungen bei Eisenmangelanämie nach Durchfluß- und Feulgenphotometrie.

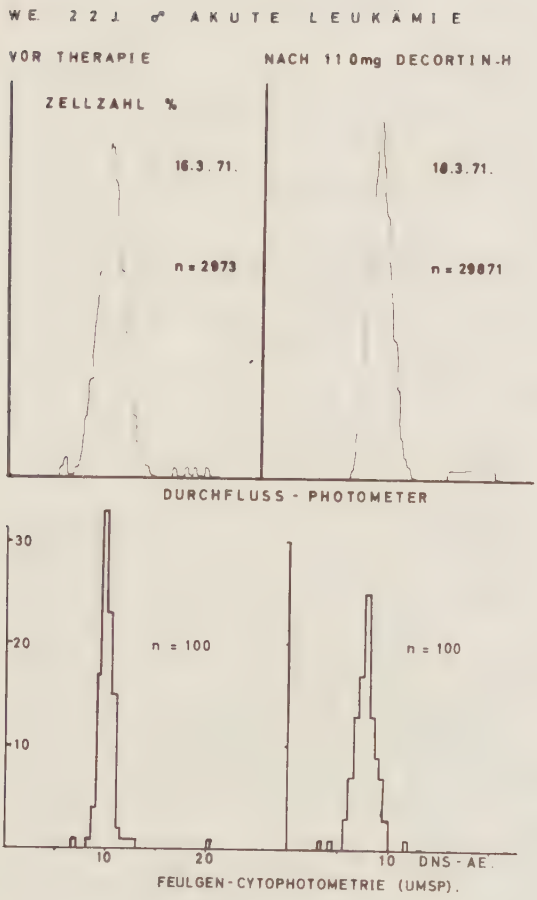

Abb. 18: Vergleichende Durchflußphotometrie und Feulgenphotometrie vor und nach 110 mg Decortin-H bei Lymphoblastenleukämie.

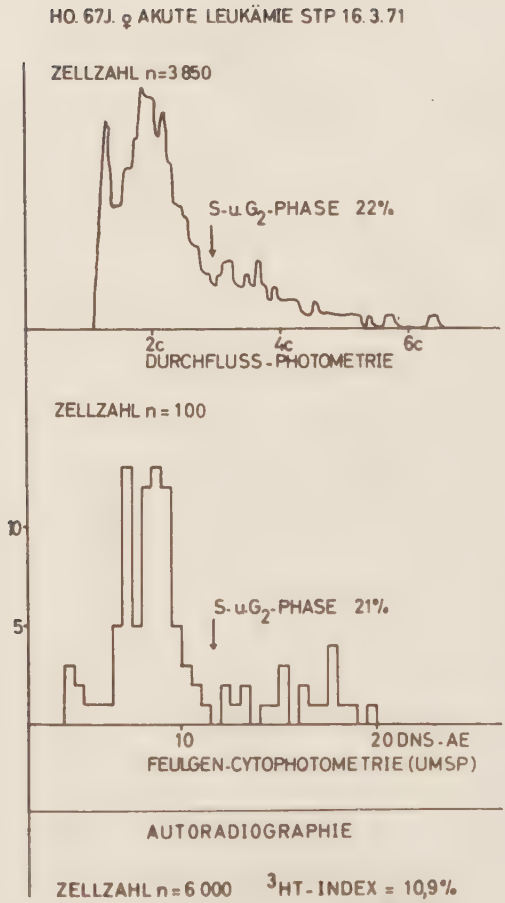

Abb. 19: Vergleichende DNS-Bestimmungen nach Durchflußphotometrie, Feulgenphotometrie und Autoradiographie.

Literaturverzeichnis

1. BOCK, H. E., HARTJE, J., MÜLLER, D. und W. WILMANNS
Thyminnucleotid-Synthese und Proliferation von Knochenmarkzellen bei megaloblastären Anämien unter der Einwirkung von Vitamin B_{12}.
Klin. Wschr. 45, 176 - 188 (1967)

2. BÖHM, N. and E. SPRENGER
Fluorescence cytophotometry: A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA.
Histochemie 16, 100 - 118 (1968)

3. DITTRICH, W. und W. GÖHDE
Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspensionen.
Zschr. Naturforschung 24b, 360 - 361 (1969)

4. FITZGERALD, P. H., R. D. MENZIES, P. E. CROSSEN, and F. W. GUNZ
Cytogenetic and cytochemical studies on marrow cells in B_{12} and folate deficiency.
XIth. Congr. int. Soc. Haemat., Sydney 1966

5. FLIEDNER, T. M., E. P. CRONKITE und V. P. BOND
Das Studium der Proliferationsdynamik der Myelopoese unter Verwendung der Einzelzellautoradiographie.
Folia haemat. N. F. 6, 210-228 (1962)

6. GAVOSTO, F.
Proliferative capacity of acute leukaemic cells.
Nature (London) 187, 611 - 612 (1960)

7. GAVOSTO, F., PILERI, A. e MARAINI, G.
Incorpirazione di dimidiana marcata con tritio negle elementi del midello vesseo normale e leucemico. Indogini autoradiografiche.
Haematologica 44, 977 - 992 (1959)

8. GAVOSTO, F., PILERI, A., BACHI, C. and PEGORARO, L.
Proliferation and maturation defect in acute leukaemia cells.
Nature (London) 203, 92 - 94 (1964)

9. GAVOSTO, F., PILERI, A., GABUTTI, V., MASERA, P.
Cell population kinetics in human acute leukaemia.
Europ. J. Cancer 3, 301 - 307 (1968)

10. GÖHDE, W. und W. DITTRICH
Impulsfluorometrie - ein neuartiges Durchflußverfahren zur ultraschnellen Mengenbestimmung von Zellinhaltsstoffen.
Vortrag XIII Symp. der Gesellsch. f. Histochemie Graz 1969

11. GRAUMANN, W.
Zur Standardisierung des Schiffschen Reagenz.
Z. wiss. Mikr. 61, 225 - 226 (1953)

12. HUBER, CH., H. HUBER, A. STACHER und H. BRAUNSTEINER
Autoradiographisch - zytophotometrische Untersuchungen zur Hämatopoese primär refraktärer und sideroachrestischer Anämien.
Blut, Bd. XXIV, 3, 142 - 152 (1972)

13. KILLMANN, S. A.
Proliferative acitivity of blast cells in leukemia and myelofibrosis.
Acta med. 178, 263 - 280 (1965)

14. KILLMANN, S. A.
Acute leukemia: The kinetics of leukemic blast cells in man.
Ser. Haematol. 1, 3, 38 - 102 (1968)

15. KILLMANN, S. A., CRONKITE, E. P., BOND, V.P. and FLIEDNER, T. M.
Proliferation of human leukemic cells studied with tritiated thymidine in vivo.
Proc. VIIIth Congr. europ. Soc. Haemat. Vienna 1961, Nr. 63 (Karger, Basel, Freiburg London, New York, 1962)

16. KILLMANN, S. A., CRONKITE, E. B., FLIEDNER, T. M. and BOND, V. P.
Mitotic indices of human bone marrow cells. III. Duration of some phases of erythrocytic and granulocytic proliferation computed from mitotic indices.
Blood 24, 267 - 280 (1964)

17. KOLLER, S.
Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen.
Verlag Theodor Steinkopff, Dresden-Leipzig 1940

18. MASIN, F. and M. MASIN
Cell distribution technique.
Acta Cytolog. 13, No 10, 541 - 542 (1969)

19. MAUER, A. M. and FISHER, V.
Comparison of the proliferative capacity of acute leukaemia cells in bone marrow and blood.
Nature (London) 193, 1085 - 1086 (1962)

20. MAUER, A. M. and FISHER, V.
In vivo study of cell kinetics in acute leukemia.
Nature (London) 197, 574 - 576 (1963)

21. MÜLLER, D., HAUSSMANN, W. und R. LEBHERZ
Studium der Proliferationsdynamik von Blutzellen mit Hilfe cytophotometrischer DNS-Bestimmungen in der Einzelzelle. II. Untersuchungen der Erythropoese.
Klin. Wschr. 47, 49 - 57 (1969)

22. MÜLLER, D., ORYWALL, D., HÜBNER, N.
Vergleichende zytogenetische und quantitativzytochemische DNS-Untersuchungen bei akuten Leukämien.
Blut XXIII, 287 - 301 (1971)

23. LE PECQ, J. B. and C. PAOLETTI
A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids.
J. Mol. Biol. 27, 87 - 106, (1967)

24. RIS, H. and E. MIRSKY
Quantitative cytochemical determination of desoxyribonucleic acid with Feulgen nuclear reaction.
J. gen. Physiol. 33, 125 - 146 (1949)

25. SPRENGER, E. und N. BÖHM
Qualitative und quantitative Fluoreszenzmikrospektrographie mit dem Leitz - Mikrospektrographen.
Histochemie 25, 163 - 176 (1971)

26. SPRENGER, E., N. BÖHM und W. SANDRITTER
Durchflußfluoreszenzcytophotometrie für ultraschnelle DNS-messungen an großen Zellpopulationen.
Histochemie 26, 238 - 257 (1971)

27. STRYCKMANS, P., E. P. CRONKITE and T. M. FLIEDNER
DNA - synthesis time of erythropoietic and granulopoietic cells in human beings.
Schweiz. med. Wsch. 98, 1278 - 1279 (1966)

28. WAKISAKA, G., H. UCHINO, S. SHIRAKAWA, Y. YOSHIDA and A. TODO
Studies on the DNA synthesis of megaloblasts.
XIth Congr. int. Soc. Haemat., Sydney 1966

29. WILMANNS, W. und J. HARTJE
Autoradiographische und enzymchemische Untersuchungen der DNS-Synthese in Leukämiezellen. II.
Thymidin - Kinase und ^{3}H - Thymidin - Markierungsindex unter cytostatischer Therapie.
Klin. Wschr. 48, 788 - 794 (1970)

Die vorliegenden impulscytophotometrischen Untersuchungen wurden von Februar 1971 bis September 1971 in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen durchgeführt.

Herrn Privatdozent Dr. Müller bin ich für die mannigfaltigen Anregungen und Ratschläge zu vielem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 11. August 1949 wurde ich, Elisabeth Reichert, als Tochter des Kaufmanns Walter Reichert und der Ruth geb. Braun in Weil im Schönbuch geboren.

Nach vier Grundschuljahren in Weil im Schönbuch besuchte ich bis zum Abitur 1968 das Wildermuth-gymnasium in Tübingen.

Im Wintersemester 1968 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Tübingen, das ich am 18. Juli 1974 mit dem Staatsexamen abschloß.